

学校编码: 10384

分类号__密级__

学号: 21720081152617

UDC__

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

核因子 NF90 与 NF45 的结构生物学研究

Structural Studies of
Nuclear Factor 90 and Nuclear Factor 45

指导教师姓名: 林天伟 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2011 年 4 月

论文答辩时间: 2011 年 5 月

学位授予日期: 2011 年 7 月

答辩委员会主席: _____

评 阅 人: _____

年 月

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。
本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

声明人(签名):

年 月 日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

- ☒ 1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于
2014 年 9 月 1 日解密，解密后适用上述授权。
- ☐ 2. 不保密，适用上述授权。

声明人（签名）：

年 月

目录

摘 要	VI
1 前言	1
1.1 双链 RNA 结合蛋白简介	1
1.2 核因子 NF90 和 NF45 简介	1
1.2.1 核因子 NF90 蛋白家族成员和 NF45 结构域简介	1
1.2.2 核因子 NF90/NF45 功能简介	3
1.3 结构生物学简介	7
1.4 蛋白质结晶技术简介	8
1.4.1 蛋白质结晶的基本过程	9
1.4.2 蛋白质结晶的基本方法	10
1.4.3 影响蛋白质结晶的因素	11
1.4.4 结晶条件的筛选和优化	13
1.5 研究内容, 方法及目的	14
1.5.1 研究内容	14
1.5.2 研究方法	15
1.5.3 研究目的	15
2 实验材料	16
2.1 基因序列	16
2.2 质粒及菌种	16
2.3 主要试剂	17
2.4 主要仪器	18
2.5 常用试剂制备	19
2.5.1 琼脂糖电泳试剂	19
2.5.2 SDS-PAGE 蛋白电泳试剂	19
2.5.3 基因克隆相关试剂	20
2.5.4 蛋白质表达与纯化相关试剂	20

3 实验方法	22
3.1 分子克隆方法	22
3.1.1 重组质粒的构建	22
3.1.2 PCR 引物设计	24
3.1.3 PCR 扩增目的片段	25
3.1.4 质粒载体的小量制备	26
3.1.5 双酶切反应	26
3.1.6 LIC 法构建阳性克隆	27
3.1.7 CaCl_2 法制备感受态细胞	28
3.1.8 质粒转化大肠杆菌感受态细胞	28
3.2 重组蛋白表达纯化方法	28
3.2.1 重组蛋白的预表达	28
3.2.2 重组蛋白的纯化	30
3.3 重组蛋白晶体生长实验	32
3.3.1 蛋白样品和结晶条件的准备	32
3.3.2 蛋白质结晶方法	34
3.4 硒代蛋白晶体生长实验	35
3.4.1 硒代重组蛋白的表达	35
3.4.2 硒代重组蛋白样品的纯化和结晶	35
4 实验结果	36
4.1 重组蛋白的克隆构建	36
4.2 重组蛋白的预表达	38
4.3 重组蛋白的纯化	38
4.3.1 NF90 的纯化	38
4.3.2 NF90N42 的纯化	41
4.3.3 NF45 的纯化	44
4.3.4 NF90N42/NF45 Complex 的纯化	46

4.4 动态光散射 (DLS) 分析 NF90N42/NF45 Complex 均一性.....	51
4.5 晶体生长结果	52
4.6 NF90N42/NF45 Complex 蛋白晶体衍射和晶体结构解析	54
5 结果分析和讨论.....	57
参考文献:	58
附录 缩略词	62
致谢语	63

CONTENTS

1 Introduction	1
1.1 Introductions to dsRNA-Binding Proteins	1
1.2 Introductions to NF90 and NF45	1
1.2.1 Introductions to Domains of NF90 and NF45	1
1.2.2 Introductions to Functions of NF90 and NF45	3
1.3 Introductions to Structural Biology	7
1.4 Introduction to Protein Crystallography	8
1.4.1 Basic process of Protein Crystallography	9
1.4.2 Basic Methods of Protein Crystallography	10
1.4.3 Factors that Influence Protein Crystallization	12
1.4.4 Screening and Optimization of Protein Crystallization	13
1.5 Content and purpose of the research	14
1.5.1 Content of the research	14
1.5.2 Methods of the research	15
1.5.3 Purpose of the research	15
2 Materials	16
2.1 Gene Sequence	16
2.2 Plasmid and Bacteria	16
2.3 Reagents	16
2.4 Apparatus	17
2.5 Reagents Preparation	19
3 Methods	21
3.1 Methods of Molecular Cloning	21
3.2 Methods of protein Expression and Purification	27
3.3 Methods of Crystal Screening and Optimization	32
3.4 Methods of Se-protein Crystal Optimization	23
4 Results	34
4.1 Constructions of Recombinant Plasmids	36

4.2 Pre-expression of Recombinant Proteins	36
4.3 Purification of Recombinant Proteins	38
4.3.1 Purification of NF90	38
4.3.2 Purification of NF90N42	41
4.3.3 Purification of NF45	44
4.3.4 Purification of NF90N42/NF45 Complex	46
4.4 DLS analysis of NF90/NF45 Complex	51
4.5 Results of Crystal Screening and Optimization	52
4.6 X-ray diffraction and Structure Processing	54
5 Discussions	57
References	58
Appendix abbreviation	62
Acknowledgements	63

摘 要

双链 RNA 结合蛋白在转录激活, 翻译控制, mRNA 的加工和细胞定位等细胞代谢活动中起着关键作用。核因子 NF90 和 NF45 是双链 RNA 结合蛋白家族中的重要成员。NF90 蛋白家族成员和 NF45 组成异源二聚体, 主要共同存在于细胞核中。NF90/NF45 的复合物作为 dsRNA 结合蛋白, 能够和细胞内的其他蛋白质因子结合形成复合物, 共同调控基因的表达。在许多研究中发现, NF45 具有增强 NF90 活性的作用。

NF90/NF45 复合物能够调节 T 细胞中白细胞介素-2 (IL-2) 基因的表达, 是 IL-2 基因表达的重要调控因子, 为 T 细胞免疫应答的调节提供了新的治疗靶点。NF90/NF45 的复合物调节丙型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus, HCV) 基因组 RNA 的转录和复制, 在 HCV 的生活史中起着重要的作用, 为抗 HCV 药物的研究提供了一个潜在的新靶点。NF90 能够与流感病毒 (influenza virus) 的核蛋白 NP 的相互作用。NF90 通过与 NP 的 C 端相互作用, 抑制流感病毒基因组的复制和 mRNA 的翻译。这类宿主细胞的核因子与病毒核蛋白的相互作用, 是宿主细胞抗病毒的一种重要机制。

以往的研究仅局限于核因子 NF90 和 NF45 的功能。本论文采用结构生物学方法解析 NF90 和 NF45 的三维结构, 以期能够从结构生物学角度阐述 NF90/NF45 在基因表达调控和抗病毒作用中的分子机制, 为药物设计和其它生物学功能的研究奠定基础。

本论文运用原核表达系统大量表达可溶的 NF90 和 NF45, 运用亲和层析、离子交换层析、肝素层析、凝胶过滤层析等手段纯化重组蛋白, 筛选并优化蛋白质结晶条件, 成功得到了 NF90N42 (NF90 N 端片段) 和 NF45 复合物的晶体, 获得了分辨率为 2.9 Å 的 X-ray 衍射数据。为解析出 NF90N42/NF45 蛋白质的三维结构和进行相关的药物设计工作奠定了基础。

关键词: NF90; NF45; X射线晶体学

Abstract

Double-stranded-RNA (dsRNA) binding proteins play critical roles in several aspects of cellular metabolism, including transcriptional activation, translational control, and mRNA processing and localization. Nuclear factor 90 (NF90) and nuclear factor 45 (NF45) are important members of the dsRNA binding proteins family. Members of NF90 family and NF45 form a heterodimer and are predominantly localized in the nucleus and interact with other proteins in the cell to regulate gene expression. It is found that the dsRNA binding property is directly associated with NF90 while NF45 functions to enhance the activity of NF90.

NF90/NF45 complex regulates inducible IL-2 transcription, mRNA stability, and gene expression in T cells and represents a novel therapeutic target for the modulation of T cell immune response. NF90/NF45 complex regulates the replication and the translation of the HCV genomic RNA, and is a potential target for antivirals. NF90 interacts with NP of influenza virus through its C-terminal, inhibiting both viral genome replication and mRNA transcription.

In the past, studies on NF90 and NF45 mainly focus on their functions. In this study, we work to solve the three-dimensional structure of NF90 and NF45 in order to clarify the molecular mechanism of NF90/NF45 in the regulation of gene expression and antiviral activities, which will provide structure basis for better understanding of NF90/NF45 function and development of antivirals.

We use *E.coli* expression system to obtain soluble NF90 and NF45 recombinant proteins which are purified by affinity, ion exchange, heparin, and gel filtration chromatographies. High quality crystals of NF90N42 (NF90 N-terminal fragment) and NF45 complex are obtained and the structure is being determined to 2.9Å resolution.

Key words: NF90; NF45; X-ray crystallography

1 前言

1.1 双链 RNA 结合蛋白简介

双链 RNA 结合蛋白在转录激活，翻译控制，mRNA 的加工和细胞定位等细胞代谢活动中起着关键作用。目前为止，一共发现了大约 26 种双链 RNA 结合蛋白。大部分的双链 RNA 结合蛋白都含有一段序列称为双链 RNA 结合模块，简称为 dsRBM，dsRBM 大约含有 65-70 个氨基酸残基^[1]。dsRBM 在进化上是非常保守的，它既能结合双链 RNA 也能结合有结构象腺病毒 RNA 那样的单链 RNA^[2]，从儿调节蛋白质之间的相互作用^[3]。

1.2 核因子 NF90 和 NF45 简介

1.2.1 核因子 NF90 蛋白家族成员和 NF45 结构域简介

核因子 NF90 和 NF45 是双链 RNA 结合蛋白家族中的重要成员。NF90 蛋白家族包括 NF90a/b/c，NF110a/b 五种蛋白质，这五种蛋白质是由 ILF3 基因经过选择性剪接翻译后形成，因此存在较高的同源性^[4-7]。NF90 蛋白家族成员如图 1-1 所示：

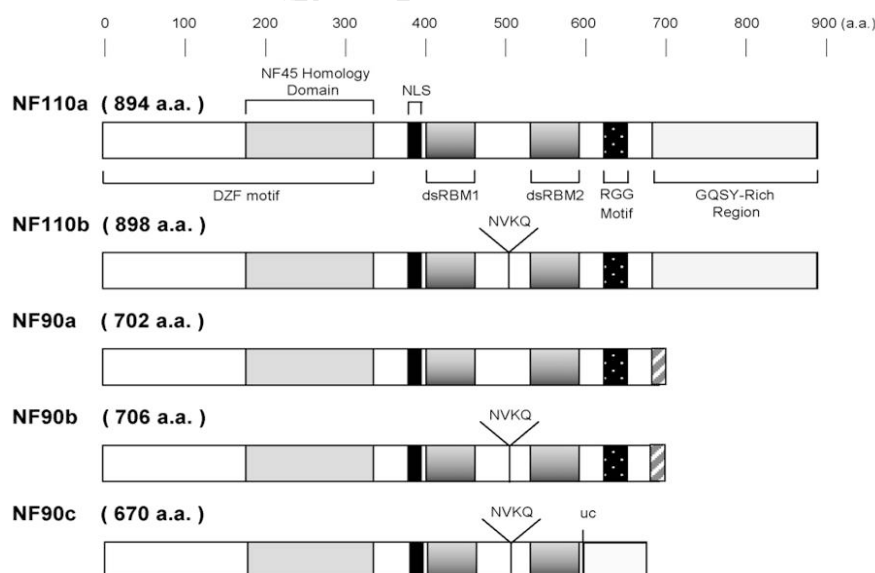


图 1-1 NF90 蛋白家族成员

Fig. 1-1 Members of NF90 Family

从蛋白质一级结构序列来观察，NF90 蛋白家族成员在 N 端和中心区域具有高度的同源性，但是在 C 端不同，NF110a/b 氨基酸序列长于 NF90a/b/c 的氨基酸序列^[8]。NF90 蛋白家族成员都含有 1 个锌指结构域(1aa-100aa, zinc-finger nucleic acid binding domain, DZF)，1 个富含精氨酸和甘氨酸的 RGG 结构域，1 个双边核定位信号(371aa-390aa, Bipartite Nuclear Localization Signal, 如图 1-2 所示)，2 个 dsRBM (400aa-466aa, 525aa-593aa)，1 个出核信号(104aa-114aa, nuclear Export Signal)^[9]。锌指结构是核酸结合蛋白所特有的一个结构域，在 NF90 蛋白家族所含有的锌指结构中，有一段与核因子 NF45 同源的氨基酸序列(135aa-338aa)。NF90b/c 和 NF110b 与 NF90a 和 NF110b 相比，在 2 个 dsRBM 之间多插入了 NVKQ4 个氨基酸残基。

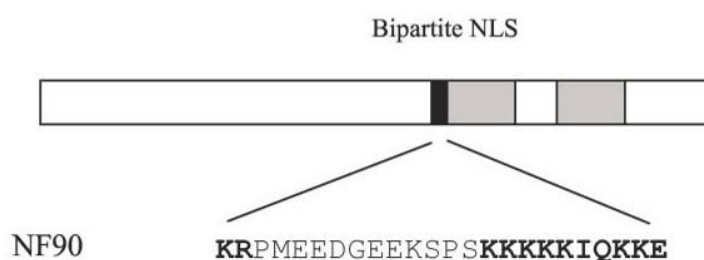


图 1-2 NF90 双边核定位信号

Fig. 1-2 Bipartite NLS of NF90

图示说明：黑色加黑字体代表核定位信号序列

核因子 NF45 是由 ILF2 基因翻译而来，一级序列由 390 个氨基酸残基组成，与 NF90 有较高的同源性。与 NF90 相比，NF45 别的氨基酸序列中包括：1 个富含精氨酸和甘氨酸的 RGG 结构域(2aa-22aa)，1 个锌指结构域(104aa-338aa，与 NF90 蛋白家族具有同源性)和一个富含谷氨酸的结构域(365aa-390aa)(如图 1-3)。NF45 是由 ILF-2 基因表达的。NF90 蛋白家族成员和 NF45 组成异源二聚体，主要共同存在于细胞核中。

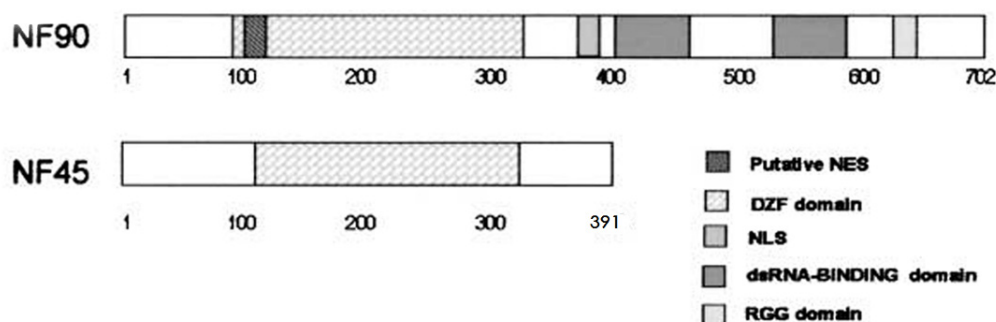


图 1-3 NF90 与 NF45 的结构域比较

Fig. 1-3 Domains of NF90 and NF45

1.2.2 核因子 NF90/NF45 功能简介

NF90/NF45的复合物能够结合白细胞介素-2 (IL-2) 基因启动子区域的抗原反应识别原件 (ARRE, antigen receptor response element)。NF90/NF45复合物最早也是在激活的Jurkat T细胞系中作为结合在IL-2基因抗原反应识别原件上的核因子被分离和发现的^[10]。在许多种细胞系和人类胎盘中, NF90和NF45也是作为复合物共同存在的^[11-18]。

NF90/NF45的复合物作为dsRNA结合蛋白, 能够和细胞内的其他蛋白质因子结合形成复合物, 共同调节细胞的生命代谢活动。在许多研究中发现, NF45具有增强NF90活性的作用^[19]。

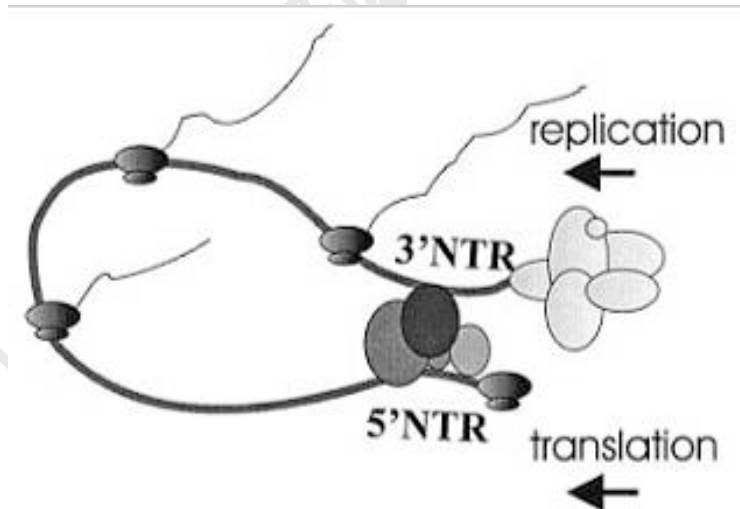
(1) NF90/NF45复合物能够调节T细胞中白细胞介素-2 (IL-2) 基因的表达^[20-24]。

IL-2是由激活的T细胞产生的, 在T细胞免疫应答中发挥着重要的作用, 它具有活化T细胞, 刺激NK细胞增殖, 增强NK杀伤活性及产生细胞因子, 诱导LAK细胞产生, 促进B细胞增殖和分泌抗体, 激活巨噬细胞的作用。T细胞在激活前能够抑制白介素-2的表达, 因此在T细胞免疫应答中, 调节IL-2基因的表达十分重要。在外界抗原刺激下, NF90/NF45的复合物能够结合在IL-2的基因启动子的抗原反应识别原件上, 促进RNA聚合酶 II 与启动子的结合, 诱导调控IL-2基因的转录。同时NF90/NF45的复合物还能够出核与IL-2基因转录形成的mRNA的3'非编码区 (3'-UTR) 相结合, 延长IL-2 mRNA的寿命, 增强IL-2基因的表达。由此看出, NF90/NF45是IL-2基因表达的重要调控因子, 为T细胞免疫应答的调节提供了新的

治疗靶点。

(2) NF90/NF45的复合物调节丙型肝炎病毒 (Hepatitis C Virus, HCV) 基因组 RNA 的转录和复制^[11,25-27]

HCV 属于黄病毒科，是一种正链 RNA 病毒。世界上大约有1.7亿人感染了 HCV，HCV 的感染可以演变为肝硬化和肝癌，因此 HCV 严重威胁着人类的健康。据研究，在 HCV 感染的细胞中，NF90/NFAR1(NFAR-1是 NF90的 C 端异构体)，NF45和 RNA Helicase A (RHA) 组成蛋白质复合物，这个蛋白质复合物能够和 HCV 的基因组 RNA 的5'UTR 和3'UTR 相互作用，促进 HCV 基因组 RNA 的5'UTR 和3'UTR 相互靠近，形成一个环状结构，如图1-4所示。HCV 基因组 RNA 的5'UTR 和3'UTR 的相互靠近和相互作用是 HCV 协调蛋白质翻译和 RNA 复制的一个重要的决定因素。因此 NF90/NFAR1, NF45和 RHA 在 HCV 的生活史中起着重要的作用，为抗 HCV 药物的研究提供了一个潜在的新靶点。同时在对 HCV 的同属病毒牛病毒性腹泻病毒 (Bovine Viral Diarrhea Virus, BVDV) 的研究中也有类似的发现。



Isken,O., Grassmann,C.W., Sarisky,R.T., Kann,M., Zhang,S., Grosse,F., Kao,P.N. and Behrens,S.E. Members of the NF90/NFAR protein group are involved in the life cycle of a positive-strand RNA virus. [J]. EMBO J., 2003, 22(21):5655–5665.

图1-4 [NF90/NFAR-1, NF45, RHA]介导的HCV基因组RNA成环模型

Fig. 1-4 Model of a circularized viral RNA mediated by [NF90/NFAR-1, NF45, RHA]

(3) NF90与流感病毒 (Influenza Virus) 的核蛋白 (Nucleoprotein, NP) 的相互作用^[28-31]

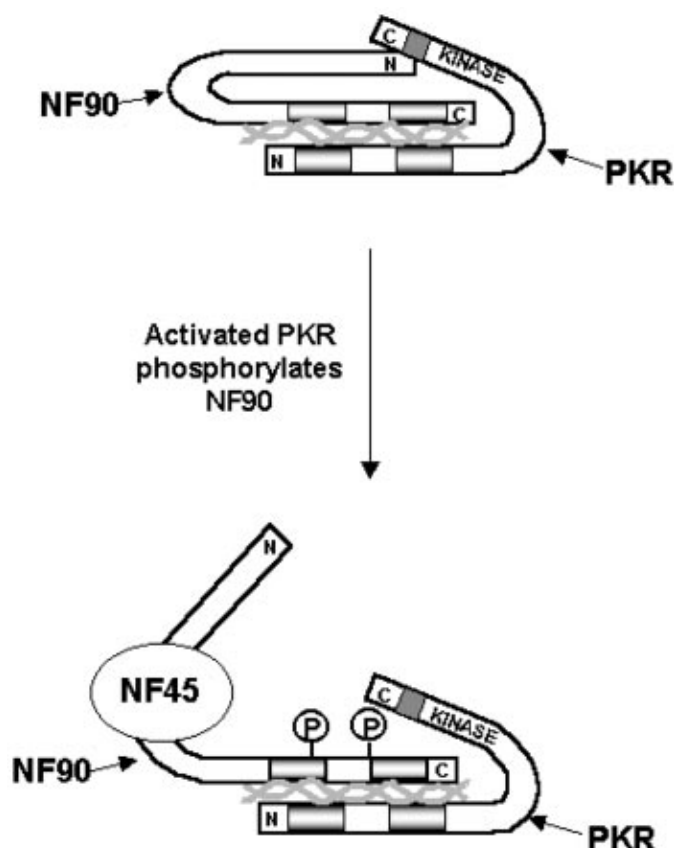
流感病毒 (Influenza viruses), 属正粘病毒科, 是一种RNA病毒, 它在感染人, 动物后能引起一种急性呼吸道传染病—流感, 严重时可导致死亡。流感病毒的转录和翻译都发生在宿主细胞的细胞核内, 流感病毒的核蛋白NP在病毒的转录和复制过程中具有重要的作用。流感病毒核蛋白NP与流感病毒基因组编码的PB1、PB2、PA组成核转录复合体, 负责流感病毒基因组的复制和转录。NF90通过NP的C端与NP相互作用, 抑制流感病毒基因组的复制和mRNA的转录。NF90作为宿主细胞的核因子通过与流感病毒核蛋白NP的相互作用, 是宿主细胞抗病毒的一种重要机制。

(4) NF90/NF45复合物与PKR的相互作用^[32-36]。

PKR是依赖于RNA的蛋白质激酶 (RNA-Dependent Protein Kinase), 它能使真核细胞翻译起始因子2 (IF-2) 发生磷酸化。NF90/NF45和PKR在细胞核和细胞质中都会形成复合物。在体外实验中, NF90和NF45都可以作为PKR磷酸化的底物。NF90通过2个独立的机制与PKR相互作用。一个是不依赖于RNA的NF90N端 (1aa-150aa) 与PKR的C端(481aa-520aa)的相互作用, 另一个是依赖于RNA的NF90的2个dsRBM结构域与PKR的2个dsRBM结构域之间的相互作用。NF90的N端结构域能够抑制其C端结构域被PKR磷酸化。

NF45与NF90结合后, 引起NF90构象上的变化, 增强了NF90的活性。NF90构象上的改变又会导致其C端被PKR磷酸化, 与NF45的作用相同的是, NF90被PKR磷酸化以后, 改变了NF90的构象, 进一步提高了NF90的活性, 调节基因的转录。NF90/NF45与PKR的相互作用模型如图1-5所示。

NF90还能抑制PKR的活性, 具体的抑制机制还不清楚。NF90可能通过直接与PKR的结合, 或者通过竞争性结合能够激活PKR的dsRNA来抑制PKR的活性, 也可能2种抑制机制都存在。



Parker, L.M., Fierro-Monti, I. and Mathews, M.B. Nuclear factor 90 is a substrate and regulator of the eukaryotic initiation factor 2 kinase double-stranded RNA-activated protein kinase. [J]. J. Biol. Chem., 2001, 276(35): 32522-32530.

图 1-5 NF90/NF45 和 PKR 相互作用模型模型

Fig. 1-5 Model for NF90 interactions with PKR.

(5) NF90/NF45复合物是MicroRNA生物合成过程中的负调节因子^[37-39]

MicroRNA (miRNA) 是一类由内源基因编码的长度约为22个核苷酸的非编码单链RNA分子。miRNA通过与目标mRNA分子的3'端非编码区相结合来调控真核细胞基因的表达。miRNA主要在基因转录后水平发挥调控作用。作为重要的调节分子，miRNA参与生命过程中一系列的重要进程，包括发育、病毒防御、造血过程、器官形成、细胞增殖和凋亡、脂肪代谢等等。NF90/NF45的复合物能够与miRNA前体(pri-miRNA)相结合，阻止作用于pri-miRNA的酶复合物与pri-miRNA的结合，阻碍由pri-miRNA生成miRNA的过程，从而减少miRNA的合成，进而调控基因的表达。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to etd@xmu.edu.cn for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库